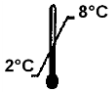
IMMUCOR

Coffret Pak Lx™

REF PLX IVD CE



Attention !
Consulter la documentation d'accompagnement.

Photosensible
(À conserver à l'abri de la lumière)

MATCHIT! Logiciel d'anticorps anti-plaquettes v1.0.1 (REF **888622**)

MATCHIT! Logiciel d'anticorps anti-plaquettes - Manuel de l'utilisateur (REF **LC1371**)

MATCHIT! Logiciel d'anticorps anti-plaquettes - Guide de référence rapide (REF **LC1374**)

TABLE DES MATIÈRES

UTILISATION **2**
RÉSUMÉ ET EXPLICATION **2**
PRINCIPE DE LA PROCÉDURE **2**
RÉACTIFS **2**
PRÉCAUTIONS **3**
MISE EN GARDE **3**
INSTRUMENTATION **3**
PRÉLÈVEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS **3**
PROCÉDURE **4**
CONTRÔLE DE QUALITÉ **7**
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS **7**
LIMITES **8**
DIAGNOSTIC DE PROBLEME **8**
CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DES PERFORMANCES **9**
RÉFÉRENCES **10**

Licence à utilisation limitée:

En ouvrant l'emballage contenant ce kit (qui contient des microbilles marquées par fluorescence autorisées par Luminex Corporation) ou en utilisant ce kit de quelque manière que ce soit, vous acceptez d'être liés par les conditions générales suivantes. Vous acceptez également que les conditions générales suivantes constituent un contrat légalement valable et exécutoire applicable à votre encontre. Si vous n'acceptez pas toutes les conditions générales suivantes indiquées ci-dessous, vous devez rapidement renvoyer ce kit afin d'en obtenir le remboursement complet, avant de l'utiliser de quelque manière que ce soit.

En tant que client, vous acquérez le droit, selon les droits de brevet de Luminex Corporation, s'il y a lieu, d'utiliser ce kit ou toute partie de ce kit, y compris mais de façon non limitative les microbilles qu'il contient, uniquement avec l'instrument laser d'analyse par fluorescence de Luminex Corporation, commercialisé sous le nom d'Instrument Luminex

UTILISATION

Le kit Pak Lx est un test immunologique qualitatif à utiliser sur l'instrument Luminex. Le test Pak Lx est conçu pour détecter et différencier les anticorps IgG des HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, GPIV et HLA de classe I dans le sérum humain.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les plaquettes expriment une grande variété de protéines polymorphes. Les changements polymorphiques au niveau des protéines, bien que n'affectant pas la fonction protéique, peuvent devenir des cibles pour les anticorps, suite à une grossesse ou une transfusion. La présence d'anticorps qui se lient aux glycoprotéines des plaquettes est associée à des troubles hémorragiques dangereux, tels que la résistance aux transfusions plaquettaires (PR), le purpura post-transfusionnel (PPT), et la thrombocytopénie allo-immune fœtale et néonatale (FNAITP).[1-13]

Les glycoprotéines (GP) ciblées par les anticorps comprennent les GPIIb/IIIa, GPIb/IX et GPIa/IIa, GPIV, et les antigènes leucocytaires humains de classe I (HLA). Les épitopes trouvés sur GPIIb/IIIa, GPIb/IX, et GPIa/IIa ont été caractérisés dans des systèmes d'antigènes plaquettaires humains (HPA) de deux allèles chacun (allèles "a" et "b"). Les HPA-1, HPA-3, et HPA-4 sont tous situés sur les GPIIb/IIIa. Le HPA-2 est situé sur la GPIb/IX et le HPA-5 est situé sur la GPIa/IIa.[14-16] Les épitopes de la GPIV sont présentés uniquement sous forme d'iso-antigènes. En d'autres termes, le développement d'anticorps anti GPIV survient chez des individus qui n'ont pas ou ont des niveaux considérablement réduits d'expression de GPIV mais qui ont été exposés à la GPIV.[17] Le HLA de classe I est codé par de nombreux allèles exprimant un grand nombre d'épitopes différents. La grande majorité des anticorps produits, en réponse à la grossesse ou à la transfusion, sera réactive au HLA de classe I hautement polymorphe.[18]

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Les microbilles du Pak Lx sont reconstituées et incubées avec un échantillon de sérum à température ambiante. Les billes sont ensuite lavées pour éliminer l'anticorps non lié. Un anticorps IgG anti-humain conjugué à la phycoérythrine (PE) est ensuite ajouté. Après incubation à température ambiante, le mélange réactionnel est dilué et analysé sur l'instrument Luminex. L'intensité du signal provenant de chaque microbille est comparée à l'intensité du signal de trois microbilles contrôle négatif comprises dans le mélange de microbilles, pour déterminer sa positivité ou sa négativité à l'anticorps associé.

RÉACTIFS

Nombre maximum de tests par kit :

- **PLX : 16 tests par kit**

Tous les réactifs doivent être stockés conformément aux instructions indiquées sur l'étiquette.

	REF	
PLXB	403620	Mélange de billes lyophilisées: un mélange de billes auxquelles des glycoprotéines HPA, GPIV et HLA de Classe I ont été immobilisées avec quatre billes de contrôle Les billes sont lyophilisées dans un tampon à base de phosphate contenant de l'albumine bovine et 0,02% de méthylisothiazolone et 0,02% de bromonitrodioxane comme conservateurs. SENSIBLE À LA LUMIÈRE. Éviter l'exposition à la lumière directe pendant de longues durées (3 heures ou moins). Stocker à 2 à 8°C dans l'obscurité dans la boîte de la trousse.
PLBD	405160	Diluant de microbilles : un tampon à base de phosphate contenant du NaCl, du Tween-20, du ProClin 300, de l'albumine bovine et du sérum de souris. Stocker à 2 à 8°C.
CCX	405159	Conjugué concentré: une IgG anti-humaine de chèvre conjuguée à de la phycoérythrine fournie dans un tampon de stockage à base de phosphate contenant du NaCl, du Tween-20, de l'azoture de sodium < 0,1% et de l'albumine bovine. SENSIBLE À LA LUMIÈRE. Éviter l'exposition à la lumière directe pendant de longues durées (2 heures ou moins). Stocker à 2 à 8°C dans l'obscurité. Diluer à1:10 dans du Diluant pour conjugué avant l'utilisation.
CDX	403586	Diluant de conjugué: un tampon à base de phosphate contenant du NaCl, du Tween-20, 0,1% d'azoture de sodium, de l'albumine bovine et du sérum de souris. Stocker à 2 à 8°C.
LMWB	405314	Tampon de lavage : un tampon à base de phosphate contenant du NaCl, du Tween-20, 0,1% d'azoture de sodium, et de l'albumine bovine. Stocker à 2 à 8°C.
PCX	403595	Sérum de contrôle positif : ce sérum ou mélange de sérums est obtenu à partir d'individus présentant des anticorps anti-HPA-1a avec ou sans anticorps HLA de classe I.. Stocker à 2 à 8°C. Contient 0,1% d'azoture de sodium.

NCX	403592	Sérum de contrôle négatif : ce sérum ou mélange de sérums est obtenu à partir d'individus sans anticorps connus contre les antigènes HPA, GPIV et HLA. Stocker à 2 à 8°C. Contient 0,1% d'azoture de sodium.

PRÉCAUTIONS

- Pour usage diagnostique in vitro.
- Ne pas utiliser de réactifs qui soient troubles ou contaminés.
- Ne pas utiliser de réactifs après leur date de péremption.
- Jeter tous les contrôles positifs et négatifs inutilisés / dilués et les conjugués après usage.
- Les réactifs contenus dans le kit ne doivent pas être utilisés en combinaison avec un autre système de test.
- Le remplacement par des composants différents de ceux fournis dans ce kit peut donner lieu à des résultats incohérents ou erronés.
- Lors de dilutions, suivre les instructions du fabricant de pipette pour connaître les techniques de distribution et de rinçage appropriées.
- Il convient de FAIRE TRÈS ATTENTION pour éviter la contamination du diluant de conjugué ou du réactif IgG anti-humain. Une contamination par inadvertance de ces réactifs avec un sérum humain provoquera la neutralisation de l'IgG anti-humain et par conséquent un échec du test.
- Il convient de faire très attention pendant le pipetage dans la microplaque à filtre, que les microbilles ne collent pas à la paroi des puits, tout en veillant à ne pas toucher la membrane avec la pointe. Le contact de la membrane avec la pointe de la pipette peut provoquer une piqûre de la membrane et un échec du test.
- Il faut s'assurer, pendant les étapes d'incubation, que les microbilles ne collent pas aux parois des puits. Les contrôles positifs et négatifs doivent être inclus à chaque technique pour aider à déterminer si une erreur technique ou des échecs de réactifs ont eu lieu.
- Il faut contrôler la force du vide. Une forte dépression peut provoquer l'adhésion des microbilles à la membrane, provoquant un échec du décompte de billes.

MISE EN GARDE

- Tout les sérums humains utilisés dans les contrôles positifs et négatifs pour ce produit ~~a~~ ont été testés et se sont avérés négatifs aux anticorps anti HIV, HCV et HBsAg par des méthodes approuvées par la FDA. Aucune méthode de test ne peut toutefois offrir une garantie complète que des agents HIV, du virus de l'hépatite C, du virus de l'hépatite B ou d'autres agents infectieux sont absents. Ces matériels doivent donc être manipulés comme étant potentiellement infectieux.
- Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur, qui peut réagir avec le plomb et le cuivre contenus en plomberie pour former des azotures métalliques explosifs. Utiliser~~z~~ de grandes quantités d'eau lorsque vous jetez des réactifs dans les égouts.
- Jeter tous les réactifs après usage selon les réglementations locales.

INSTRUMENTATION

L'instrument Luminex piloté par le logiciel Luminex IS 2.3 ou xPONENT 3.1 doit être utilisé pour effectuer le test Pak Lx. Le Luminex est basé sur les principes de cytométrie de flux et comprend l'analyseur Luminex, la plate-forme de manipulation de plaque Luminex XT et le système de distribution de fluide de gaine Luminex SD, le logiciel et le PC. Le Système Luminex est la combinaison de trois technologies xMAP essentielles. La première est représentée par les microbilles, une famille de 100 microbilles de polystyrène de 5,6 microns colorées par fluorescence qui agissent à la fois comme identifiant et comme surface solide pour réaliser le test. La deuxième est un instrument basé sur les principes de cytométrie de flux, l'analyseur Luminex, qui intègre des composants de détection essentiels, tels que les lasers, l'optique, la fluidique et les processeurs de signal numérique à grande vitesse. Le troisième composant est le logiciel, qui est conçu pour la saisie de données basée sur un protocole.

Des informations sur les caractéristiques du logiciel, l'installation, le fonctionnement, la maintenance et la sécurité de l'instrument figurent dans le Manuel de formation du Luminex IS. L'utilisateur doit contacter la société Luminex pour toute assistance concernant l'instrument Luminex.

Les fichiers de protocole requis pour utiliser le test Pak Lx sont fournis par Immucor GTI Diagnostics sur leur site web et peuvent être téléchargés par l'utilisateur. L'utilisateur doit contacter Immucor GTI Diagnostics pour tout problème lié au produit Pak Lx. L'utilisateur doit contacter la société Luminex pour des services spécifiques concernant le système Luminex.

PRÉLÈVEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Prélever du sang sans anticoagulant à l'aide d'une technique aseptique. Traiter le sang pendant qu'il est frais pour réduire le risque d'obtention de réactions faussement-positives ou faussement-négatives, en raison de stockage inapproprié ou de contamination de l'échantillon.

Seul le sérum est adapté pour ce test.

Le sérum doit être séparé des globules rouges stocké ou expédié.

Les prélèvements contenant des particules doivent être clarifiés par centrifugation avant le test.

Des échantillons de sérum qui ne peuvent pas être testés immédiatement doivent être stockés à 2-8°C pendant un maximum de 48 heures ou congelés. Des échantillons congelés à -20°C ou en-dessous restent en bon état pendant un maximum de 2 ans. Éviter les congélateurs à dégivrage automatique. Éviter une congélation et une décongélation répétées des échantillons de sérum.

PROCÉDURE

Matériel fourni :
(voir la section RÉACTIFS pour des informations plus spécifiques)

Les flacons peuvent contenir davantage de réactif que ce qui est indiqué sur les étiquettes. Assurez-vous de mesurer le réactif avec un dispositif approprié lors de la réalisation de dilutions.

1. 3 x Mélanges de microbilles lyophilisées
2. 1 x 850 µL Diluant de microbilles
3. 1 x 120 µL de conjugué concentré
4. 1 x 1,2 ml de diluant de conjugué
5. 1 x 50 ml de tampon de lavage
6. 1 x 80 µl de sérum de contrôle positif
7. 1 x 80 µl de sérum de contrôle négatif

Matériel supplémentaire requis :
(tel qu'énuméré ou équivalent)

1. pipettes réglables de 5 µl à 50 µl avec des pointes de pipettes appropriées
2. Pipette multicanal de 250 µl avec pointes à filtre appropriées
3. Microtubes de1,5 ml pour dilutions de conjugué
4. Tubes à essai
5. chronomètre
6. Marqueur
7. Couvercle de plaque
8. Fluide de gaine Luminex
   REF 628005 (1X) ; REF 628025 (20X)
9. Microbilles de contrôle et d'étalonnage Luminex
   REF 628006 (CAL1); REF 628007 (CAL2); REF 628008 (CON1); REF 628009 (CON2)
10. Eau distillée
11. Agitateur ou vortex avec adaptateur de plaque
12. Plaques à filtres Multiscreen Millipore
    REF 888633 Millipore MSBVN1210/MSBVN1250/MABVN1210/MABVN1250
13. Laveur à vide pour microplaque
    REF 888315 Millipore MAVM0960R ; Qiagen 19504 ; Pall 5017
14. Micro-centrifugeuse
15. Fichier modèle de lecture Luminex Acquisition Template ; disponible sur le site web
    - Fichier IDT pour IS 2.3
    - Fichier LXT pour xPONENT 3.1
16. Fichier de données lot spécifique (EDS) disponible sur le site web
17. Instrument Luminex avec logiciel IS 2.3 ou xPONENT 3.1
18. **PFS** Plate Format Sheet (Feuille de plan de plaque)
19. **PACD** CD d'installation du logiciel Anticorps anti-plaquettes
    MATCHIT! - Logiciel d'Anticorps anti-plaquettes v1.0.1
    MATCHIT! - Manuel de l'utilisateur du Logiciel d'Anticorps anti-plaquettes; disponible également sur le site web
    MATCHIT! - Guide de référence rapide du Logiciel d'Anticorps anti-plaquettes; disponible également sur le site web

Procédure du test

1. Télécharger le fichier modèle de lecture Luminex spécifique au lot (fichier IDT/LXT) sur le site web (www.immucor.com) et l'enregistrer sur l'ordinateur connecté à l'instrument Luminex. Noter l'emplacement du fichier enregistré. Ce fichier sera importé sur l'instrument Luminex lors d'une étape ultérieure.

2. Porter tous les réactifs, excepté le conjugué concentré et son diluant, à température ambiante (21 à 24°C) avant utilisation.

3. Reconstituer le mélange de lyophilisées, comme indiqué dans le tableau 1 ci-dessous.

   Le nombre de flacons indiqué dans le Tableau 1 comprend un volume suffisant pour effectuer un contrôle positif et un contrôle négatif avec le nombre d'échantillons énuméré dans la colonne 1.

   Tableau 1

Nombre d'échantillons	Flacon(s) de Mélange de microbilles lyophilisées
1-4	1
5-10	2
11-16	3

   a. Ajouter 275 µL de diluant de microbille à chaque flacon de microbilles lyophilisées. Laisser le flacon reconstitué à température ambiante pendant au moins 5 minutes.

   b. **Ne pas** mélanger ou faire tourbillonner les microbilles lyophilisées avec le diluant de microbilles à ce moment-là.

      - Les flacons reconstitués peuvent être stockés à 2-8°C, dans l'obscurité pendant un maximum de 15 jours.

      ATTENTION : NE PAS REGROUPER LES FLACONS RECONSTITUÉS SUR DIFFÉRENTS JOURS EN UN SEUL .

      ATTENTION : NE PAS VORTEXER LES MICROBILLES PENDANT LE TEST AFIN D'ÉVITER LA FORMATION DE MOUSSE.

4. Préparer les échantillons en les vortexant. Centrifuger à ≥ 10.000 x g pendant au moins 60 secondes pour décanter la matière insoluble avant l'utilisation.

5. Enregistrer les informations relatives à l'échantillon sur la fiche de présentation de la plaque. La fiche de présentation de la plaque est prête à être téléchargée sur notre site web (www.immucor.com).

6. Couvrir les puits non utilisés de la plaque à filtre filtrante avec un couvercle de plaque.

7. Ajouter 250 µl de tampon de lavage aux puits utilisés.

   a. Laisser le tampon de lavage au repos dans les puits pendant au moins 3 minutes.

   b. Enlever le tampon de lavage par une aspiration douce en utilisant le laveur à vide.
   (Voir les recommandations du fabricant pour une utilisation correcte.)

8. Mélanger les microbilles reconstituées par une série de pipetage environ 15 à 20 fois en veillant à **éviter toute formation de mousse**.

9. Ajouter 40 µL de microbilles reconstituées à chaque puits utilisé sur la plaque à filtre. S'assurer que les microbilles reconstituées sont mélangées pendant leur distribution sur la plaque à filtre. Effectuer 2-3 pipetages aller-retour tous les 2-3 puits.

   ATTENTION : Il est important de conserver les microbilles resuspendues afin d'assurer leur distribution uniforme dans les puits. Un mauvais mélange des microbilles pourra provoquer leur sédimentation dans le fond du flacon. Une distribution inégale des microbilles dans les puits pouvant affecter les temps de lecture ainsi que résultats.

10. Ajouter 10 µl de sérum du patient ou de sérum contrôle en se référant au plan de plaque.

11. Remettre le reste des sérums contrôle et des microbilles au réfrigérateur à 2- 8°C, dans l'obscurité, pour permettre leur utilisation ultérieure.

12. Couvrir la plaque pour la maintenir à l'obscurité.

13. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante (21 à 24°C), dans l'obscurité, sur un agitateur rotatif (environ 200 rotations par minute) ou sur un Vortex avec un adaptateur de plaque, réglé à une vitesse permettant un mélange correct sans éclaboussure des échantillons.

   a. Pendant cette incubation, amener le conjugué concentré et le diluant de conjugué à température ambiante (21 à 24°C).

   b. Pendant cette Incubation, préchauffer et préparer l'instrument Luminex.

   c. Paramétrer le test sur l'instrument Luminex, en utilisant le fichier IDT/LXT spécifique au lot (modèle de lecture) téléchargé sur le site web (www.immucor.com). Se référer au manuel du logiciel Luminex sur la façon d'ajouter/importer un fichier modèle dans le logiciel.

NOTE : Pour l'utilisation de la fonctionnalité "Automated Batch Setup" se référer au Manuel de l'utilisateur disponible sur le CD d'installation (PACD) et sur notre website (www.immucor.com).

ATTENTION : Si vous n'utilisez pas le fichier IDT/LXT correct, la collecte de données par l'instrument Luminex sera incorrecte ou incomplète les données de l'essai.

14. Diluer le conjugué, en mélangeant les volumes de conjugué concentré (CCX) avec le diluant de conjugué (CDX), comme indiqué dans le tableau 2 ci-dessous. Le nombre de flacons indiqué dans le Tableau 2 inclut un volume suffisant pour effectuer un contrôle positif et un contrôle négatif avec le nombre d'échantillons énumérés dans la colonne 1.

    a. Conserver le conjugué dilué dans l'obscurité et à température ambiante jusqu'à utilisation.

    b. Remettre le reste de conjugué concentré et son diluant au réfrigérateur à 2 à 8°C, dans l'obscurité, pour permettre leur utilisation ultérieure.

    Tableau 2

Nombre d'échantillons	Volume de CCX (µL)	Volume de CDX (µL)
1	20.0	180.0
2	25.0	225.0
3	30.0	270.0
4	35.0	315.0
5	40.0	360.0
6	45.0	405.0
7	50.0	450.0
8	55.0	495.0
9	60.0	540.0
10	65.0	585.0
11	70.0	630.0
12	75.0	675.0
13	80.0	720.0
14	85.0	765.0
15	90.0	810.0
16	95.0	855.0

15. Après l'incubation de 60 minutes, enlever le couvercle de la plaque et ajouter 200 µL de tampon de lavage à chaque puits. Enlever le tampon de lavage par une aspiration douce en utilisant le laveur à vide.

    ATTENTION : L'utilisation d'un vide excessif provoquera l'adhésion des microbilles sur la membrane et pourra donner lieu à un échec pour cet échantillon. Appliquer le vide **minimum** requis pour laver les échantillons.
    Se référer aux instructions du fabricant pour l'utilisation des plaques à filtre et du laveur par aspiration.

16. Ajouter 250 µL de tampon de lavage à chaque puits, aspirer. Répéter deux fois l'opération.

    ATTENTION : Un lavage incomplet peut réduire la capacité du conjugué à détecter l'IgG liée aux microbilles sensibilisées.

17. Ajouter 50 µL de conjugué dilué à chaque puits. Couvrir avec le couvercle de plaque. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (21 à 24°C), dans l'obscurité, sur un agitateur rotatif (environ 200 rotations par minute) ou un Vortex avec un adaptateur de plaque, réglé à une vitesse permettant un mélange correct sans éclaboussure des échantillons. Ne pas garder le conjugué dilué pour une utilisation ultérieure.

18. Enlever le couvercle de plaque. Ajouter 150 µL de tampon de lavage à chaque puits contenant l'échantillon. Remettre le reste du tampon de lavage au réfrigérateur, à 2 à 8°C, pour permettre son utilisation ultérieure.

19. Collecter immédiatement les données avec l'instrument Luminex, en respectant les recommandations du fabricant.

    NOTE : Un minimum de 60 événements doit être collecté par type de microbilles.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les sérums de contrôle positif et négatif servent de contrôles externes pour l'essai et doivent être inclus dans chacune des séries d'analyses. Le sérum de contrôle positif est préparé à partir de sérum disponible de donneurs et peut changer d'un lot à l'autre de Pak Lx. Le sérum de contrôle positif doit montrer un résultat positif pour les anticorps qui sont repris dans le certificat de contrôle de qualité. Le sérum de contrôle négatif doit montrer un résultat négatif pour toutes les perles HPA, GPIV ou HLA de classe I. Si ces exigences ne sont pas remplies, les échantillons affectés devront être considérés comme non valides.

Le contrôle de qualité de l'essai Pak Lx est compris dans le système d'analyse par inclusion de quatre perles de contrôle (une perle de contrôle positif et trois perles de contrôle négatif). La perle de contrôle positif est tapissée d'IgG humaines et doit produire des valeurs d'IMF (intensité médiane de fluorescence) >10.000 avec le sérum de contrôle négatif. Si des valeurs d'IMF sont <10.000 avec le sérum de contrôle négatif, l'essai peut avoir été insuffisamment lavé ou le conjugué peut être douteux. Les échantillons peuvent présenter une large fourchette de réactivité avec la perle du contrôle positif, mais doivent produire un signal d'IMF >3.500. Si ces exigences ne sont pas remplies, les échantillons affectés devront être considérés comme non valides.

L'interprétation des données d'échantillons est basée sur le recueil d'un nombre minimum de chaque bille pendant le test. Lorsque trop peu d'événements de billes sont obtenus pour un échantillon, l'erreur « problème de billes » s'affiche et tous les résultats d'anticorps de l'échantillon affecté sont considérés non valides.

Veuillez consulter la section de diagnostic de problème de ces instructions pour de plus amples détails.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Interprétation par le logiciel : Le logiciel MATCHIT! d'anticorps anti-plaquettes v1.0.1 est nécessaire pour interpréter les résultats. Pour l'analyse, un fichier EDS spécifique au lot est nécessaire et est disponible pour téléchargement sur le site web (www.immucor.com).

Détermination de la réactivité des billes individuelles : Afin de déterminer si une bille spécifique à un antigène est positive ou négative, la MFI de la bille spécifique à l'antigène est divisée par les MFI de chaque bille contrôle négatif (CON1, CON2, CON3), produisant ainsi trois ratios pour chaque bille spécifique à l'antigène. Remarque : lorsque la MFI d'une bille CON est inférieure à la valeur du seuil minimum (MC), alors la MC est utilisée pour le calcul. À partir des trois ratios calculés, un ratio prédéterminé, le facteur d'ajustement du bruit de fond (BAF) est soustrait à chacun pour obtenir trois ratios ajustés.

- Une valeur positive pour deux ou plus des trois ratio ajustés indique une réaction positive.
- Une valeur négative pour deux ou plus des trois ratio ajustés indique une réaction négative.

Interprétation des résultats : Se référer au rapport du logiciel MATCHIT! pour les résultats. Le tableau ci-dessous énumère les résultats possibles qui pourraient être obtenus lors du test d'un échantillon quelconque.

Antigène	**GPIV**	**HLA Classe I**	**HPA-1, -3, -4 (GPIIb-IIIa)**	**HPA-2 (GPIb-IX)**	**HPA-5 (GPIa-IIa)**
Résultat possible	Pos Neg	Pos Neg	Réactif Neg	Pos Neg Indéterminé	Pos Neg Indéterminé

- Les résultats pour les HLA Classe I, GPIV, HPA-2 et HPA-5 sont directement rapportés par le logiciel MATCHIT!
- Tous les résultats indéterminés pour les HPA-2 et HPA-5 doivent être répétés en utilisant le test Pak Lx ou à l'aide d'une méthode alternative.
- Pour déterminer la réactivité des HPA-1, -3 et -4, utiliser le tableau suivant :

HPA coatées sur les billes	**Modèle de réactivité de bille****					
HPA – 1a-3a-4a	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
HPA – 1a-3b-4a	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg
HPA – 1b-3a-4a	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg
HPA – 1b-3b-4a	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg
HPA – 1ab-3ab-4a	Pos*	Pos*	Pos*	Pos*	Pos*	Neg
HPA - 1a-3ab-4b	Pos	Neg	Pos*	Pos*	Neg*	Pos
Interprétation des résultats	Anticorps anti HPA-1 détectés		Anticorps anti HPA-3 détectés		Anticorps anti HPA-4 détectés	
Ce modèle peut masquer la présence d'un anticorps réactif avec :	HPA-4b	HPA-4b — non masqué	HPA-4b	HPA-4b	HPA-1a, -1b, -3a, -3b	HPA-1a, -1b, -3a, -3b non masqué

* Des microbilles hétérozygotes peuvent être positives ou négatives en fonction du titre de l'anticorps dans l'échantillon ou du niveau de bruit de fond sur les microbilles contrôle négatif.

**. Tout profil non représenté dans le tableau ci-dessus doit être considéré comme un résultat indéterminé et peut être du à la présence d'auto-anticorps ou la combinaison d'auto et d'allo-anticorps. Il peut également être du à une réactivité sur d'autres variants polymorphiques non identifiés dans le test.

LIMITES

- Ce produit n'a pas été conçu pour détecter les anticorps de la classe d'immunoglobuline IgA ou IgM.
- Les résultats de ce test ne doivent pas être utilisés en tant que seule base de décision clinique. Un test positif indique uniquement la présence d'anticorps spécifiques pour les HLA classe I, GPIV, ou HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4 et HPA-5, et n'est pas destiné à diagnostiquer un état clinique.[19-21]
- Les systèmes HPA surviennent à différentes fréquences dans des populations différentes. Les systèmes HPA de fréquence sont considérés comme "publics" tandis que les systèmes HPA de faible fréquence sont considérés comme "privés". Le test Pak Lx utilise des glycoprotéines prélevées sur des donneurs qui n'ont été typés que pour les systèmes HPA publics suivants: HPA-1, -2, -3, -4, et -5. Trois de ces systèmes HPA publics (HPA-1, -3, -4) se présentent sur la même glycoprotéine, GPIIb/IIIa.[1,5,11,14] Des échantillons de sérum peuvent avoir des anticorps dirigés contre un ou plusieurs de ces systèmes HPA publics, et la présence d'anticorps dirigés contre un système HPA peut masquer la présence d'anticorps dirigés contre d'autres systèmes. Par exemple, la présence d'un titre élevé d'anticorps dirigé contre un épitope HPA-4 peut masquer la présence d'anticorps de titre inférieur dirigés contre un des épitopes HPA-1. Pour de plus amples informations, consulter la section dénommée « interprétation des résultats. »
- Le test Pak Lx utilise des glycoprotéines prélevées sur des donneurs qui n'ont pas été typés pour les systèmes HPA privés. Des échantillons de sérum peuvent avoir des anticorps dirigés contre un ou plusieurs de ces systèmes HPA privés. La présence de tels anticorps peut simuler les profils de réactivité qui indiqueraient la présence d'un anticorps dirigé contre un épitope HPA public et/ou provoquer des résultats indéterminés.
- Quelques anticorps de faible titre, de faible avidité, incluant les anticorps dirigés contre les antigènes HLA classe I de faible incidence, peuvent ne pas être détectés par ce produit.
- Ce test n'a pas été validé pour une utilisation dans la détection des auto-anticorps.

DIAGNOSTIC DE PROBLEME

PROBLÈME	CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Le sérum de contrôle positif présente une réactivité d'anticorps supplémentaire non indiquée dans le certificat de CQ	Contrôle Positif contaminé avec un autre échantillon	Employer une bonne technique de laboratoire y compris des méthodes de pipetage correctes pour éliminer le transfert d'échantillons vers des puits adjacents ; répéter l'essai
	Mauvais lavage	Répéter l'essai en suivant les instructions de lavage
Le sérum de contrôle négatif présente une réactivité d'anticorps positive	Réactifs contaminés	Employer une bonne technique de laboratoire y compris des méthodes de pipetage correctes pour éliminer le transfert d'échantillons vers des puits adjacents ; répéter l'essai
	Mauvais lavage	Répéter l'essai en suivant les instructions de lavage
Pour le sérum de contrôle négatif, la valeur de MFI sur les billes de contrôle positif (Sonde 77) est < 10 000	Conjugué photodégradé	Utiliser une nouvelle trousse, répéter l'essai
	Mauvais lavage	Répéter l'essai en suivant les instructions de lavage
Pour les échantillons à tester, la valeur de MFI sur les billes de contrôle positif (Sonde 77) est < 3 500	Conjugué photodégradé	Utiliser une nouvelle trousse, répéter l'essai
	Mauvais lavage	Retester l'échantillon en suivant les instructions de lavage
Les valeurs de MFI sur les microbilles présentant les antigènes sont d'environ 30 MFI tandis que la MFI de microbilles de contrôle positif est > 10 000	Echantillon non ajouté	Retester l'échantillon
Problème de billes (faible décompte d'événements avec les billes) (< 60 événements collectés)	Billes mal mélangées ou mal resuspendues	Bien mélanger avec la pipette pour que les billes soient totalement resuspendues ; retester l'échantillon
	Panne de l'instrument - hors étalonnage	Voir le Manuel de l'Instrument ; répéter l'essai
	Panne de l'instrument - -Blocage du flux d'échantillons	Voir le Manuel de l'Instrument; répéter l'essai
	Microbilles photodégradées	Utiliser un nouveau kit; retester l'échantillon
	Vide trop fort/billes collées à la membrane	Réduire la force du vide ; retester l'échantillon

Résultats impossibles à interpréter	Utilisation d'un fichier modèle d'acquisition incorrect (IDT/LXT).	Vérifier si le numéro de lot dans le fichier IDT/LXT utilisé pour la saisie des données est conforme au kit Pak Lx utilisé pour le test. S'il est incorrect, répéter l'essai et saisir les données en utilisant le fichier IDT/LXT approprié .
	Utilisation d'un fichier EDS (BAF) incorrect pour réaliser l'analyse avec le logiciel MATCHIT! Platelet Antibody	Vérifier si le numéro de lot dans le fichier EDS utilisé pour la saisie des données est conforme au kit Pak Lx utilisé pour le test. S'il est incorrect, répéter l'analyse des données en utilisant le fichier EDS approprié.

CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DES PERFORMANCES

Les tableaux suivants énumèrent pour les échantillons testés la co-positivité (sensibilité), la co-négativité (spécificité) et la corrélation pour les anticorps dirigés contre chaque HPA ou GPIV, avec les résultats obtenus, par la technique d'immobilisation d'anticorps monoclonaux d'antigènes plaquettaires (MAIPA) ; ou des anticorps dirigés contre des antigènes HLA de classe I par rapport aux résultats obtenus avec le test LifeScreen Deluxe Assay (LMX). Ces données sont compilées à partir de deux études cliniques réalisées au Service diagnostic de Sanquin (Amsterdam, Pays Bas) et à la BloodCenter of Wisconsin (banque de sang) (Milwaukee, Wisconsin).

MAIPA (HPA-1)

		Positif	Négatif	Total				
Test Pak Lx (HPA-1)	**Positif**	52	2	54	Corrélation :	99,4%	Intervalle de confiance de 95% =	97,9 – 99,8%
	Négatif	0	292	292	Co-positivité :	100,0%	Intervalle de confiance de 95% =	93,1 – 100,0%
	Total	52	294	346	Co-négativité:	99,3%	Intervalle de confiance de 95% =	97,6 - 99,8%

MAIPA (HPA-2)

		Positif	Négatif	Total				
Test Pak Lx (HPA-2)	**Positif**	8	0	8	Corrélation :	99,7%	Intervalle de confiance de 95% =	98,4 – 99,1%
	Négatif	1	336	337	Co-positivité :	88,9%	Intervalle de confiance de 95% =	56,5 – 98,0%
	Total	9	336	345	Co-négativité:	100,0%	Intervalle de confiance de 95% =	98,9 – 100,0%

MAIPA (HPA-3)

		Positif	Négatif	Total				
Test Pak Lx (HPA-3)	**Positif**	4	0	4	Corrélation :	99,4%	Intervalle de confiance de 95% =	97,9 – 99,8%
	Négatif	2	341	343	Co-positivité :	66,7%	Intervalle de confiance de 95% =	30,0 - 90,3%
	Total	6	341	347	Co-négativité:	100,0%	Intervalle de confiance de 95% =	98,9 – 100,0%

MAIPA (HPA-4)

		Positif	Négatif	Total				
Test Pak Lx (HPA-4)	**Positif**	4	0	4	Corrélation :	100,0%	Intervalle de confiance de 95% =	97,7 – 100,0%
	Négatif	0	160	160	Co-positivité :	100.0%	Intervalle de confiance de 95% =	51.0 – 100.0%
	Total	4	160	164	Co-négativité:	100.0%	Intervalle de confiance de 95% =	97.7 – 100.0%

MAIPA (HPA-5)

		Positif	Négatif	Total				
Test Pak Lx (HPA-5)	**Positif**	29	1	30	Corrélation :	99.1%	Intervalle de confiance de 95% =	97.4 – 99.7%
	Négatif	2	297	299	Co-positivité :	93,5%	Intervalle de confiance de 95% =	79,3 - 98,2%
	Total	31	298	329	Co-négativité:	99,7%	Intervalle de confiance de 95% =	98,1 - 99,9%

MAIPA (GPIV)

		Positif	Négatif	Total
Test Pak Lx (GPIV)	**Positif**	5	0	5
	Négatif	1	162	163
	Total	6	162	168

Corrélation :	99,4%	Intervalle de confiance de 95% =	96,7 – 99,9%
Co-positivité :	83,3%	Intervalle de confiance de 95% =	43,6 - 97,0%
Co-négativité:	100,0%	Intervalle de confiance de 95% =	97,7 - 100,0%

LMX (HLA Cl-I)

		Positif	Négatif	Total
Test Pak Lx (HLA Cl-I)	**Positif**	67	1	68
	Négatif	3	104	107
	Total	70	105	175

Corrélation :	97,7%	Intervalle de confiance de 95% =	94,3 – 99,1%
Co-positivité :	95,7%	Intervalle de confiance de 95% =	88,1 - 98,5%
Co-négativité:	99,0%	Intervalle de confiance de 95% =	94,8 - 99,8%

Précision

Le test Pak Lx a présenté une corrélation de 100% dans les résultats rapportés pour huit échantillons testés en duplicats, avec un même lot, sur 20 séries séparées et par deux opérateurs. Les échantillons inclus avaient une gamme de réactivité comprenant HPA-1a, -1b, -3a, -4a, -5b, GPIV, et HLA classe I.

Substances interférentes

Les études sur des substances interférentes ont été réalisées en utilisant le test d'interférence CLSI EP07-A2 indiqué dans Chimie clinique : Directive approuvée.
Les substances suivantes n'ont présenté aucune interférence avec le test Pak Lx aux concentrations indiquées :

Hémoglobine	≤ 500 mg/dl
Triglycérides	≤ 500 mg/dl
Bilirubine	≤ 20 mg/dl

RÉFÉRENCES

1. Mueller-Eckhardt C. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. Lancet 1989;1:363-366.
2. Mueller-Eckhardt C. Platelet allo-and autoantigens and their clinical implications. In: Nance SJ eds. Transfusion Medicine in the 1990s, Arlington, Va., American Association of Blood Banks 1990; 63-93.
3. Brand A. Immunological aspects of blood transfusions. Transpl.Immunol. 2002;10:183-190.
4. McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies in clinical disorders. Transfus.Apher.Sci. 2003;28:297-305.
5. Davoren A, Curtis BR, Aster RH, McFarland JG. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion 2004;44:1220-1225.
6. Rebulla P. A mini-review on platelet refractoriness. Haematologica 2005;90:247-253.
7. Kanhai HH, Porcelijn L, Engelfriet CP et al. Management of alloimmune thrombocytopenia. Vox Sang. 2007;93:370-385.
8. Stroncek DF, Rebulla P. Platelet transfusions. Lancet 2007;370:427-438.
9. Arnold DM, Smith JW, Kelton JG. Diagnosis and management of neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfus.Med.Rev. 2008;22:255-267.
10. Bussel JB, Primiani A. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: progress and ongoing debates. Blood Rev. 2008;22:33-52.
11. Curtis BR, McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies and antigens in the clinical laboratory. Immunohematology. 2009;25:125-135.
12. Vassallo RR. Recognition and management of antibodies to human platelet antigens in platelet transfusion-refractory patients. Immunohematology. 2009;25:119-124.
13. Kaplan C, Ni H, Freedman J. Alloimmune Thrombocytopenia. In: Michelson A eds. Platelets 3rd Edition. Academic Press – Elsevier. 2012; 46:953-970.
14. Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. Transpl.Immunol. 2002;10:165-181.
15. Metcalfe P et al. Nomenclature of human platelet antigens. Vox Sang. 2003; 85:240.
16. Santoso S. Human platelet alloantigens. Transfus.Apher.Sci. 2003;28:227-236.
17. Saw CL, Szykoluk H, Curtis BR et al. Two cases of platelet transfusion refractoriness associated with anti-CD36. Transfusion 2010;50:2638-2642.
18. Klein J, Sato A. The HLA system. N Eng J Med. 2000; 343:702.
19. Wu GG, Kaplan C, Curtis BR, Pearson HA. Report on the 14th International Society of Blood Transfusion Platelet Immunology Workshop. Vox Sang. 2010;99:375-381.
20. Smith GA, Ranasinghe E, Ouwehand WH. The importance of using multiple techniques for detection of platelet antibodies. Vox Sang. 2007;93:306-308.
21. Metcalfe P. Ensuring quality in platelet immunology. Vox Sang. 2007;93:287-288.

Immucor GTI Diagnostics, Inc.
20925 Crossroads Circle
Waukesha, WI 53186 USA

EC REP

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Adam-Opel-Strasse 26A
Rodermark 63322
Germany

Informations de contact aux USA et à l'international :
Support technique : waukeshatechsupport@immucor.com

www.immucor.com

LUMINEX et xMAP sont des marques commerciales enregistrées de Luminex Corporation.

MATCHIT!, Pak Lx, Immucor et les logos associés sont des marques commerciales et/ou des marques déposées de Immucor et/ou de ses filiales aux Etats-Unis et/ou dans d'autres pays.

©2012-2015 Immucor GTI Diagnostics, Inc.

303285.IFUFR Rev G
2015-05-29

Warning	Attention
H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
P261	Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P272	Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302 + P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
P333 + P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
P501	Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée.